

Korszerű identifikálási módszerek a mikrobiológiai gyakorlatban

Mráz Balázs¹, Zoller Linda¹, Fodor Andrea¹, Szántó-Egész Réka², Tabajdiné Pintér Veronika¹

¹ Wessling Hungary Kft. Mikrobiológiai Laboratórium – FoodMicro
² Biomi Kft.

Van-e benne...?

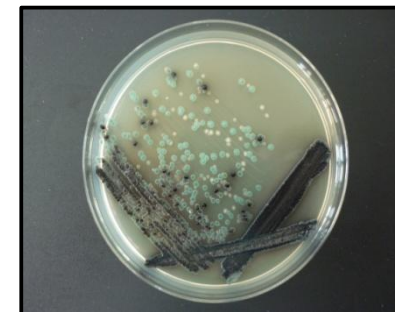
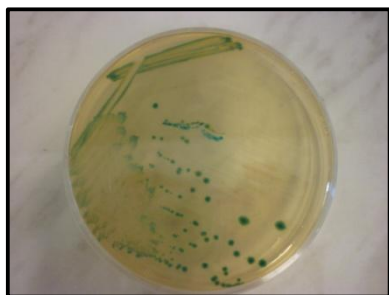
- Salmonella
- Campylobacter
- Listeria monocytogenes
- Escherichia coli O157:H7
- Brochotrix thermosphacta
- Pseudomonas sp.
- Bacillus subtilis
- Tejsavbaktériumok

Mennyi van benne?

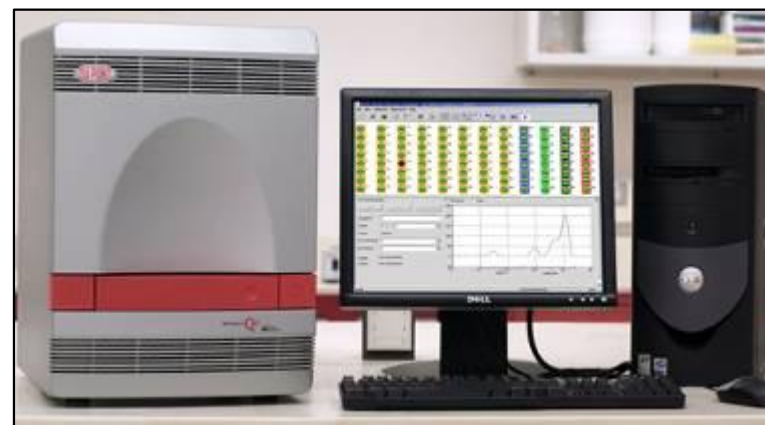
- Enterobacteriaceae
- Escherichia coli
- Mezofil aerob mikroba
- Lactobacillus sp.
- Bifidobacterium sp.
- Élesztőgombák

Jelenlét kimutatás

- Szelektív/differenciáló tápközegek

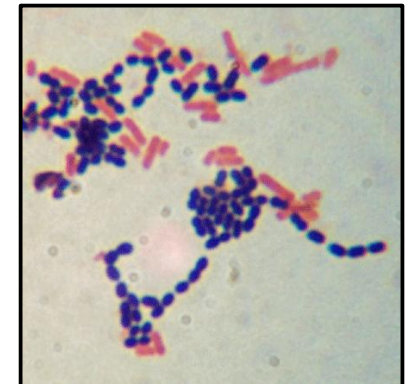
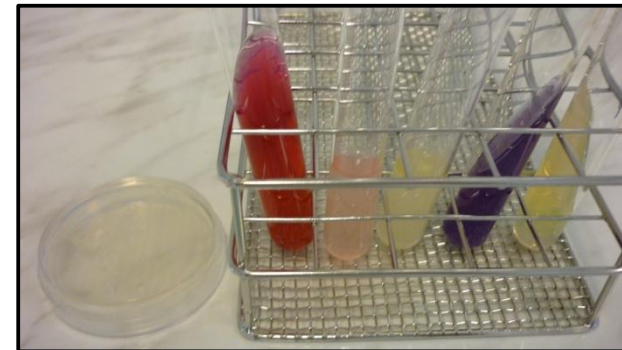
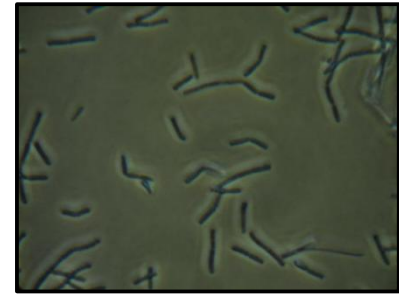


- Műszeres vizsgálatok (PCR, VIDAS)



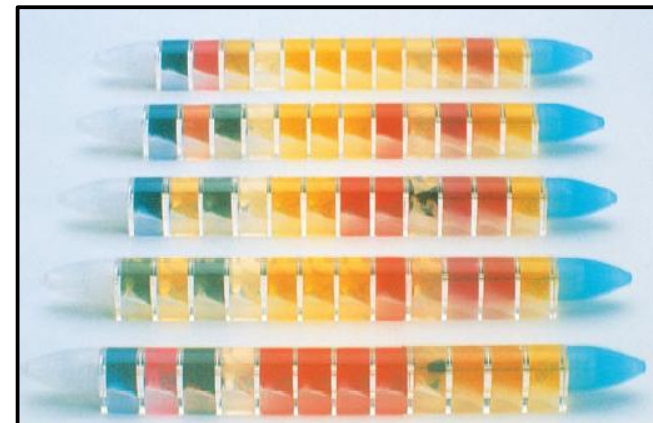
Hagyományos azonosítási módszerek, lépések

- Tiszta tenyészet készítése
- Mikroszkópos vizsgálat (sejtforma, mozgás)
- Gram-festés
- Biokémiai vizsgálatok



Kereskedelmi biokémiai tesztek

- Enterotube II (Enterobacteriaceae) ~80 baktérium
- Oxi/Ferm Tube II ~70 baktérium



Oxidáz próba

Pozitív

Negatív

Oxi/Ferm Tube II

Enterotube II

Anaerob glükóz hasznosítás

Aerob glükóz hasznosítás

Pozitív

Negatív

Aeromonas spp.,
Plesiomonas
shigelloides,
Vibrio spp.

Achromobacter spp.,
Alcaligenes spp., Bordetella
bronchiseptica, Moraxella
spp., Pasteurella spp.

Pozitív

Negatív

Enterobacteriaceae

Acinetobacter spp.,
Stenotrophomonas
maltophilia

Kereskedelmi biokémiai tesztek

- BBL Crystal
(GramPositive, E/NF, RG+, Anaerobe)
~450 mikroba



- API teszt
~600 mikroba

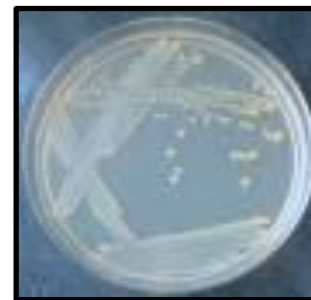


- Értékelés: pozitív/negatív, ?



Genom szintű azonosítási módszerek, lépések

- Tiszta tenyészet készítése 24-72 óra
- (Gram-festés)



DNS alapú technikák

Szekvenálás

~5-9,5 óra

Ribotipizálás

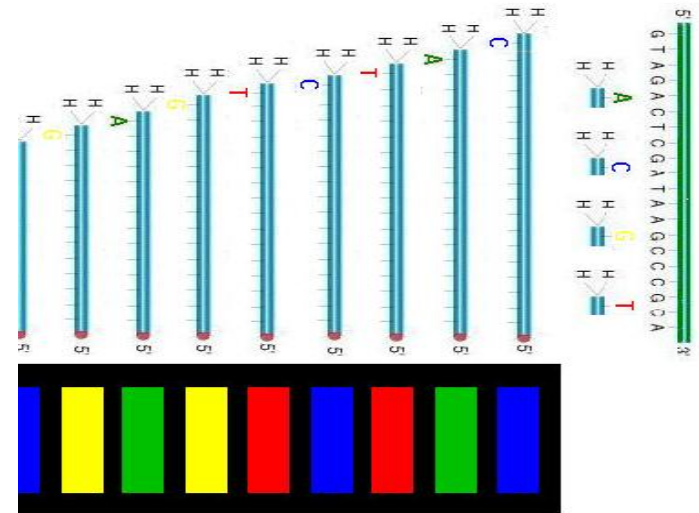
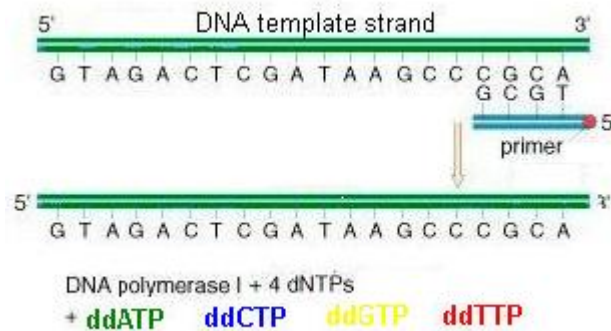
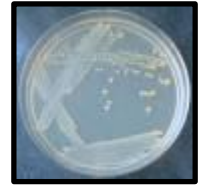
~8 óra



Szekvenálás I.

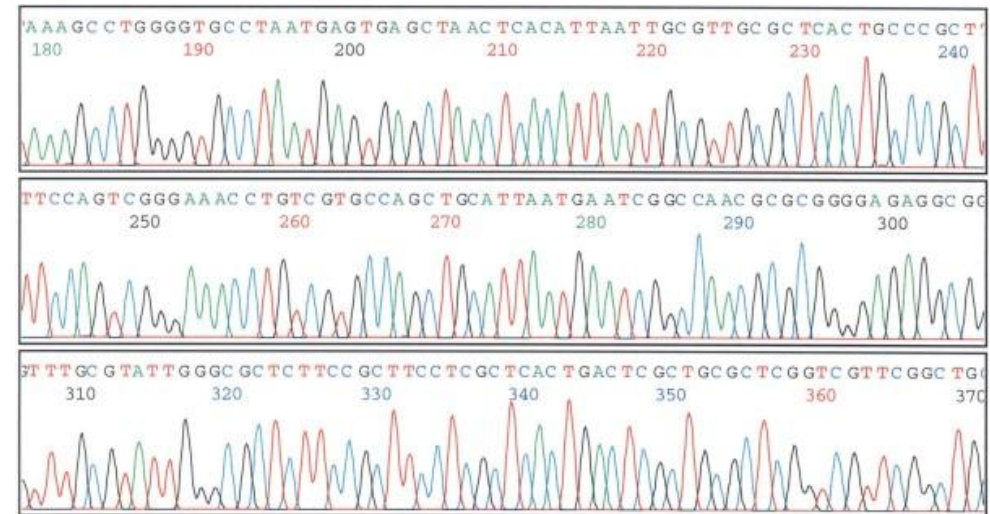
A DNS-t alkotó bázisok sorrendjének meghatározása a 16S rDNS 500-700bp hosszúságú szakaszán

- PCR (1.): 1200 – 1500 bp DNS fragment felsokszorozása
- Jelölő PCR (2.): ddNTP beépítése
- Kapilláris gélelektroforézissel történő szétválasztás



Szekvenálás II.

- Fluoreszcenz jel detektálása
- Összehasonlítás adatbázissal
bázispár elhelyezkedés, hibák (N)
helyzete/száma



BLAST, RDP – ingyenes
MicroSeq library – gyártói adatbázis ~2000 mikroba

Ribotipizálás I.

- Southern-blotting alapú molekuláris „ujjlenyomat” vizsgálata
 - DNS emésztése restrikciós enzimekkel (EcoRI, PvuII)
 - Fragmentek elválasztása gélelektroforézissel
 - Fragmentek membránra vitele és rögzítése
 - DNS jelölése
 - Detektálás
- Adatbázisban szereplő mintázatokkal történő összehasonlítás

~1400 mikroba, ~7000 mintázat

Akár törzs szintű meghatározás is lehetséges!

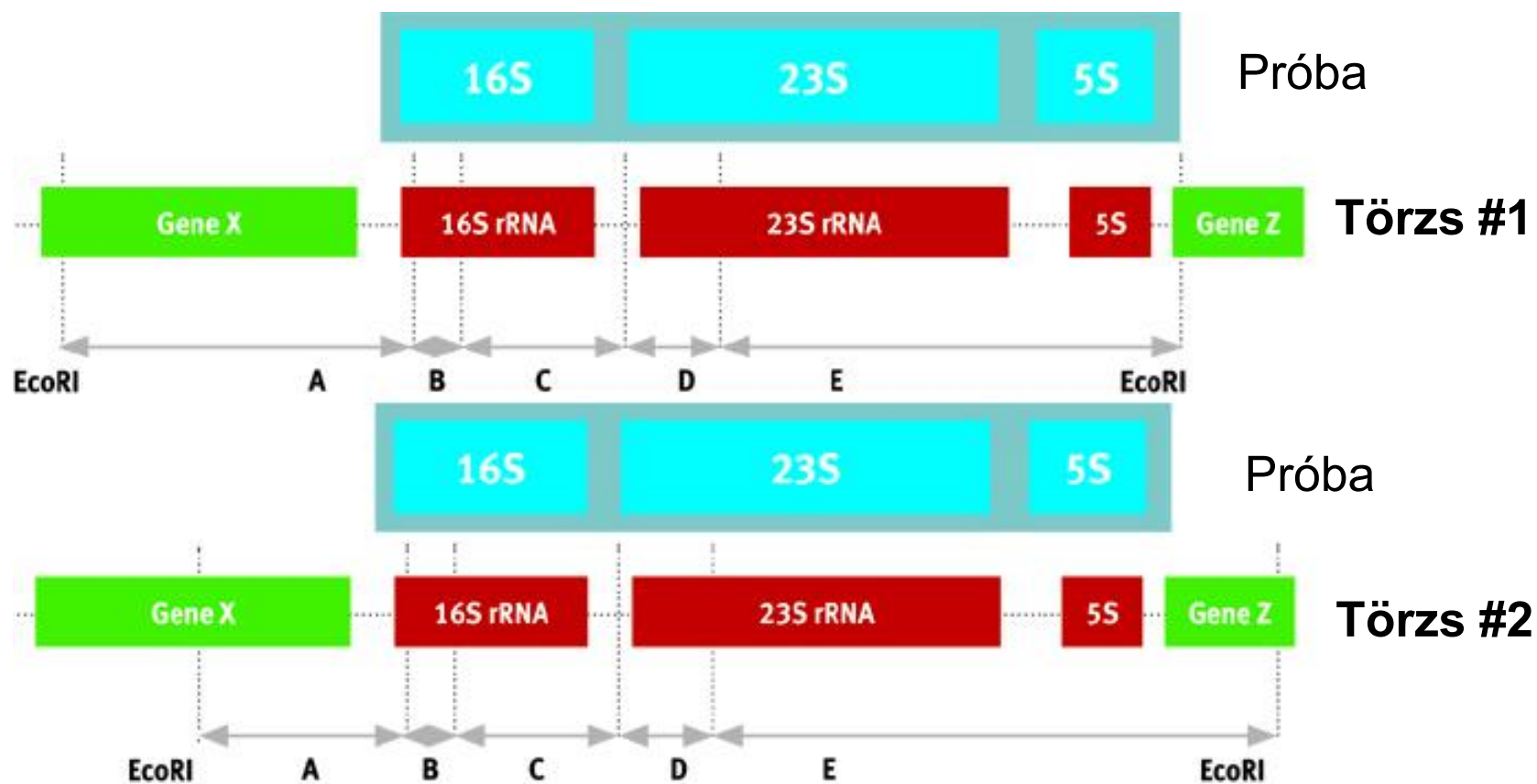
RiboPrinter[®]

- Mintaelőkészítés ~30 perc/8 minta
- Teljesen automatizált folyamat
- Eredmény: 8 óra múlva

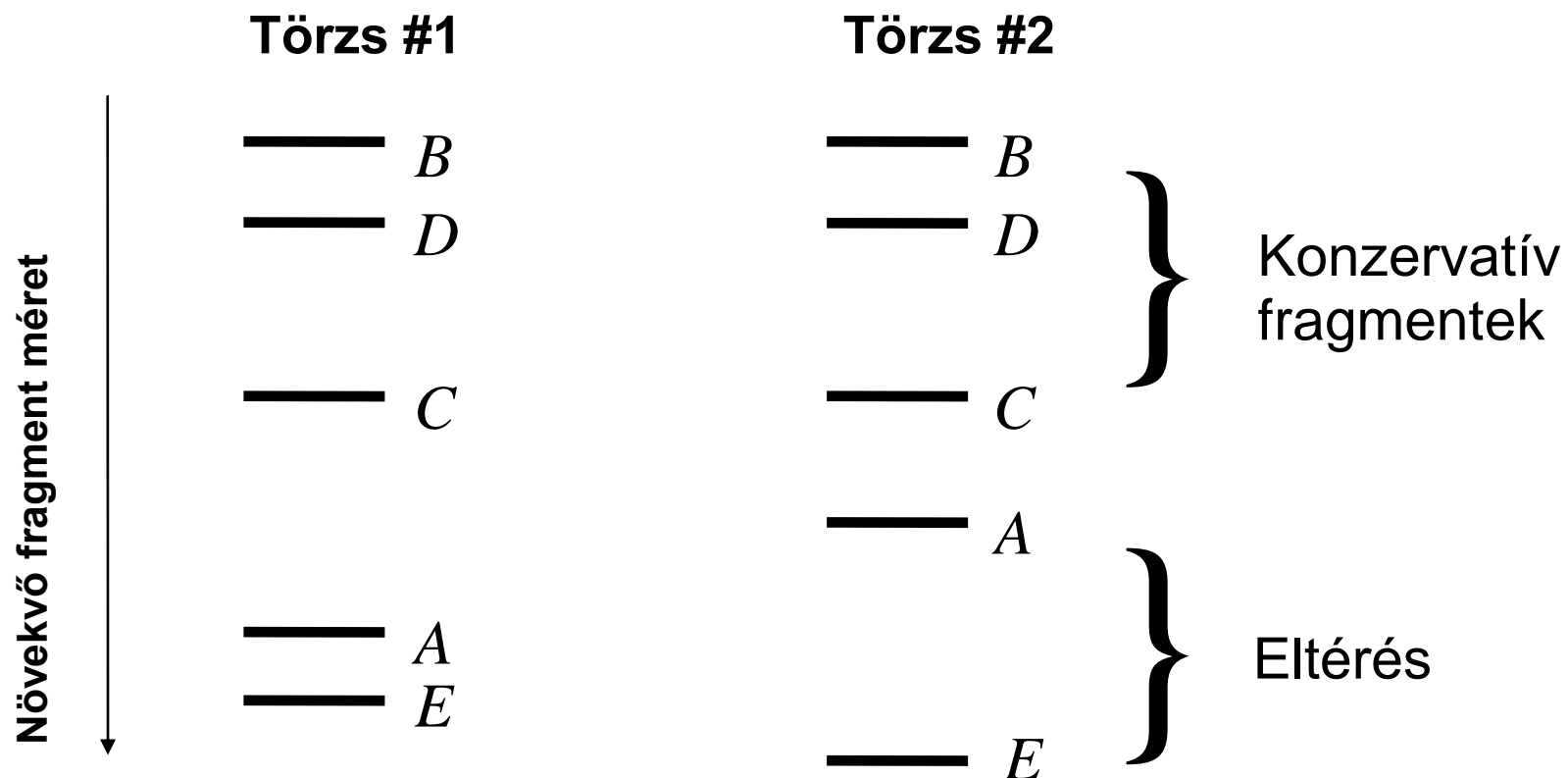


Folyamatos üzemeltetés mellett egy munkanap
alatt 32 minta futtatható.

Ribotipizálás elve I.



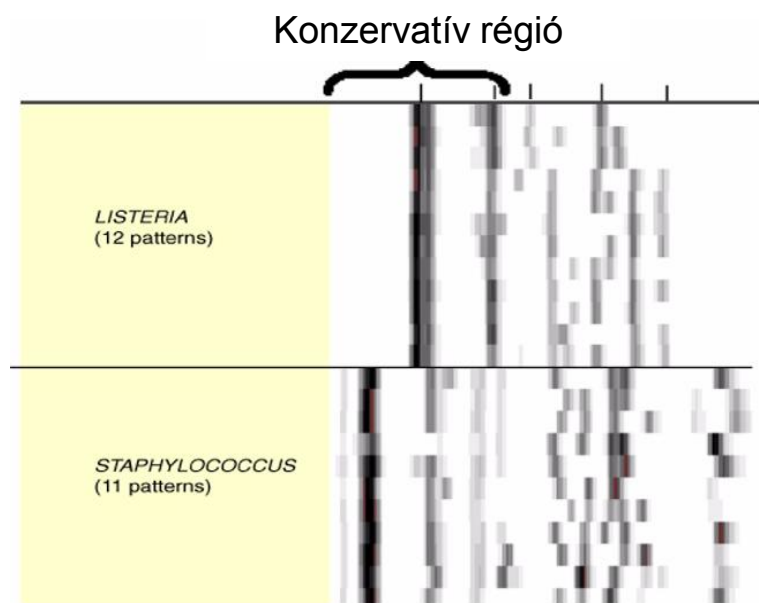
Ribotipizálás elve II.



Azonos 16S szekvencia, eltérő RiboPrint™ mintázat

Adatbázis

- A folyamat végén a rendszer automatikusan létrehozza a RiboPrint™ mintázatot

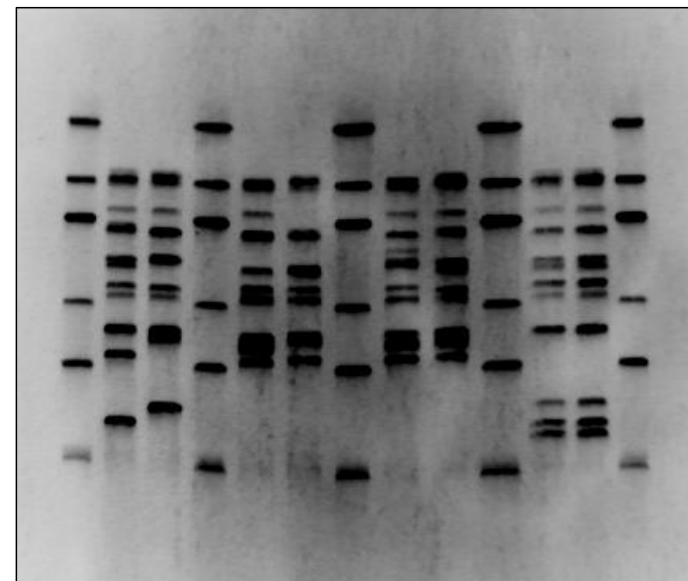


- Az adatbázis folyamatosan frissül (ATTC, DSMZ, Riken)
Felhasználás során automatikusan bővül+önállóan bővíthető

Másodlagos csoportosítás – RiboCsoport

Amennyiben a hasonlóság >90%

Forrás – Mikroba azonosítása



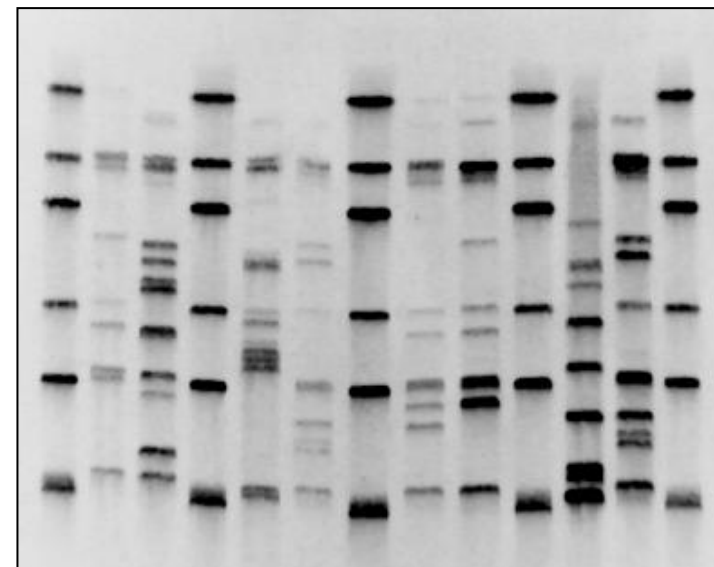
DuPont ID Label	Normalized Background	Normalized Signal	Signal to Background	RiboGroup	RiboPrint™ Pattern				
					1 kbp	5	10	15	50
Salmonella ser. Infantis	4.19	5.35	1.28	PVUII 281-10-S-1					
Salmonella ser. Enteritidis	4.73	7.94	1.68	PVUII 281-10-S-2					
Salmonella ser. Anatum	6.28	7.46	1.19	PVUII 281-10-S-3					
Salmonella ser. Cubana	6.76	4.68	0.69	PVUII 281-10-S-4					
Salmonella ser. Mbandaka	6.75	4.61	0.68	PVUII 281-10-S-5					
Salmonella ser. Litchfield	6.92	5.76	0.83	PVUII 281-10-S-6					
Salmonella ser. Typhimurium	5.08	2.65	0.52	PVUII 281-10-S-7					
Salmonella ser. Typhimurium	4.85	5.21	1.07	PVUII 281-10-S-7					

Másodlagos csoportosítás – RiboCsoport

Amennyiben a hasonlóság >90%

Az adatbázisban nem szereplő mikrobák is besorolhatók.

Forrás – Mikroba azonosítása



	Sample Number /	DuPont ID Similarity	DuPont ID	DuPont ID Label	Normalized Background	Normalized Signal	Signal to Background	RiboGroup
1	281-12-S-1	0.91	DUP-3064	Escherichia coli ser. O157:H7 #	2.47	2.08	0.84	ECORI 281-11-S-1
2	281-12-S-2	0.96	DUP-11084	Citrobacter freundii	3.49	5.90	1.69	ECORI 281-11-S-2
3	281-12-S-3	0.96	DUP-14143	Enterobacter aerogenes	3.85	4.83	1.25	ECORI 281-11-S-3
4	281-12-S-4	0.93	DUP-20162	Escherichia coli	3.60	1.78	0.50	ECORI 281-11-S-4
5	281-12-S-5	0.92	DUP-20182	Escherichia coli	3.83	3.75	0.98	ECORI 281-11-S-5
6	281-12-S-6	0.88	DUP-18664	Escherichia coli	4.14	10.53	2.55	ECORI 281-11-S-6
7	281-12-S-7				5.16	14.20	2.75	ECORI 281-11-S-7
8	281-12-S-8	0.93	DUP-20165	Escherichia coli	4.51	10.44	2.32	ECORI 281-11-S-8

Köszönöm megtisztelő figyelmüket!

